

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-9284

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月19日

| (51) Int.Cl. <sup>9</sup> | 識別記号  | F I           |
|---------------------------|-------|---------------|
| C 1 2 N 15/09             | Z N A | C 1 2 N 15/00 |
| A 6 1 K 38/46             |       | A 6 1 K 39/02 |
| 39/02                     |       | 39/40         |
| 39/40                     | A C K | C 0 7 K 16/40 |
| C 0 7 K 16/40             |       | C 1 2 N 1/21  |
|                           |       | Z N A A       |
|                           |       | A C K         |

審査請求 未請求 請求項の数24 F I (全 13 頁) 最終頁に続く

|   |                  |          |   |
|---|------------------|----------|---|
| (21) 出願番号   | 特願平9-185849      | (71) 出願人 | 000106324<br>サンスター株式会社<br>大阪府高槻市朝日町3番1号     |
| (22) 出願日  | 平成9年(1997) 6月25日 | (72) 発明者 | 奥田 克爾<br>千葉県千葉市美浜区磯辺2-2-6                   |
| 特許法第30条第1項適用申請有り 平成9年6月26日～<br>6月27日 開催の「第77回 日本細菌学会関東支部総<br>会」において文書をもって発表 |                  | (72) 発明者 | 加藤 哲男<br>千葉県船橋市飯山満町2-361-49                 |
|   |                  | (72) 発明者 | 石原 和幸<br>千葉縣市原市ちはら台4-10-2 ザウス<br>ヒルズ中央9-301 |
|   |                  | (72) 発明者 | 斎藤 徹<br>大阪府大阪市城東区古市3-9-1-709                |
|   |                  | (74) 代理人 | 弁理士 細田 芳徳                                   |

(54) 【発明の名称】 バクテロイデス・フォーサイサス由来のプロテアーゼ遺伝子

## (57) 【要約】

【課題】バクテロイデス・フォーサイサス由来の、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドをコードするDNA、該ポリペプチドの製造方法、バクテロイデス・フォーサイサスに対するワクチン、及び歯周病の診断薬を提供すること。

【解決手段】バクテロイデス・フォーサイサス (Bacteroides forsythus) の染色体DNAから得られ得るDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、該DNAにコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、該ポリペプチド又はその一部に特異的に結合する抗体、該ポリペプチド又はその一部を含有してなるワクチン、該ポリペプチド又はその一部を含有してなる、バクテロイデス・フォーサイサスによる疾患の診断薬。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 バクテロイデス・フォーサイサス (*Bacteroides forsythus*) の染色体DNAから得られ得るDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項2】 バクテロイデス・フォーサイサスがバクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株である請求項1記載のDNA。

【請求項3】 配列表の配列番号：1に示される塩基配列からなるDNA。

【請求項4】 配列表の配列番号：1に示される塩基配列の一部を有するDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項5】 配列表の配列番号：1に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項6】 配列表の配列番号：1に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、付加、挿入又は置換されたDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項7】 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA。

【請求項8】 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドをコードするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項9】 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入又は置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

【請求項10】 請求項1～9いずれか記載のDNAにコードされるポリペプチド。

【請求項11】 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

【請求項12】 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入又は置換されたポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド。

【請求項13】 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド。

【請求項14】 請求項1～9いずれか記載のDNAが挿入されてなる発現ベクター。

【請求項15】 請求項14記載の発現ベクターが導入されてなる細胞。

【請求項16】 請求項15記載の細胞を培養し、得られるプロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチ

ドを回収することを特徴とする、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドの製造方法。

【請求項17】 請求項10～13いずれか記載のポリペプチド又はその一部に特異的に結合する抗体。

【請求項18】 ポリペプチドの一部が、連続した5個以上のアミノ酸残基からなるペプチド断片である請求項17記載の抗体。

【請求項19】 個体に投与してバクテロイデス・フォーサイサスに対する感染防御免疫を誘導する活性を有する、請求項10～13いずれか記載のポリペプチド又はその一部を含有してなるワクチン。

【請求項20】 ポリペプチドの一部が、連続した5個以上のアミノ酸残基からなるペプチド断片である請求項19記載のワクチン。

【請求項21】 請求項10～13いずれか記載のポリペプチド又はその一部を含有してなる、バクテロイデス・フォーサイサスによる疾患の診断薬。

【請求項22】 ポリペプチドの一部が、連続した5個以上のアミノ酸残基からなるペプチド断片である請求項21記載の診断薬。

【請求項23】 請求項1～9いずれか記載のDNA又はその一部を含有してなる、バクテロイデス・フォーサイサスによる疾患の診断薬。

【請求項24】 請求項17又は18記載の抗体を含有してなる、バクテロイデス・フォーサイサスによる疾患の診断薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、歯周疾患の原因菌の一つであるバクテロイデス・フォーサイサス (*Bacteroides forsythus*) 由来の新規プロテアーゼ遺伝子、該遺伝子によりコードされる新規プロテアーゼに関する。さらに本発明は、かかるプロテアーゼを含有してなるワクチン等に関する。

## 【0002】

【従来の技術】歯周病は口腔における二大疾患のうちのひとつで、数種の細菌による複合感染症である。その中でバクテロイデス・フォーサイサスは進行性の歯周炎の局所から高頻度に分離されることから、成人性歯周炎や再発性歯周炎の主要な原因菌の一つと考えられている。また本菌は、菌体外プロテアーゼを産生するため、これらが病原因子として注目されている。したがって、かかるプロテアーゼについての分子生物学的なアプローチは、歯周病の発生メカニズム等の解明に寄与するところが大きいものの、かかるプロテアーゼについて、分子生物学的には全く解明されていない。

【0003】一方、歯周病の予防手段として、バクテロイデス・フォーサイサスと同じく歯周病に関与する細菌であるポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) とアクチノバチルス・アクチノマイセテ

ムコミタンス (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) の全菌体や菌体抽出物、或いは線毛を抗原とするワクチンが提案されている (特開昭59-128338号公報、特開昭61-140527号公報、特開平8-176014号公報)。また、バクテロイデス・フォーサイサスの線毛やきょう膜を抗原とするワクチンについても提案がなされている (特開平5-132428号公報)。

【0004】しかしながら、これらは、夾雑物によりワクチンの特性の低下が起こることや、安全性の点で問題があった。そこで、ボルフィロモナス・ジンジバリスとアクチノバチルス・アクチノマイセテムコミタンスについては、その線毛を構成するタンパク質のアミノ酸配列由来のペプチドを抗原とするワクチンが提案されている (特開平8-48695号公報、特開平9-52846号公報)。しかしながら、バクテロイデス・フォーサイサスについては夾雑物の影響がなく、しかも高い効果の期待できるワクチンは知られていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】したがって本発明の目的は、バクテロイデス・フォーサイサス由来の、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、バクテロイデス・フォーサイサス由来の、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法、バクテロイデス・フォーサイサスに対するワクチン、及び歯周病の診断薬を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明の要旨は、

〔1〕 バクテロイデス・フォーサイサス (*Bacteroides forsythus*) の染色体DNAから得られ得るDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔2〕 バクテロイデス・フォーサイサスがバクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株である前記〔1〕記載のDNA、

〔3〕 配列表の配列番号：1に示される塩基配列からなるDNA、

〔4〕 配列表の配列番号：1に示される塩基配列の一部を有するDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

【0007】〔5〕 配列表の配列番号：1に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔6〕 配列表の配列番号：1に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、付加、挿入又は置換されたDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔7〕 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA、

〔8〕 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドをコードするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

【0008】〔9〕 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入又は置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔10〕 前記〔1〕～〔9〕いずれか記載のDNAにコードされるポリペプチド、

〔11〕 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

〔12〕 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入又は置換されたポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド、

【0009】〔13〕 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド、

〔14〕 前記〔1〕～〔9〕いずれか記載のDNAが挿入されてなる発現ベクター、

〔15〕 前記〔14〕記載の発現ベクターが導入されてなる細胞、

〔16〕 前記〔15〕記載の細胞を培養し、得られるプロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドを回収することを特徴とする、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドの製造方法、

〔17〕 前記〔10〕～〔13〕いずれか記載のポリペプチド又はその一部に特異的に結合する抗体、

【0010】〔18〕 ポリペプチドの一部が、連続した5個以上のアミノ酸残基からなるペプチド断片である前記〔17〕記載の抗体、

〔19〕 個体に投与してバクテロイデス・フォーサイサスに対する感染防御免疫を誘導する活性を有する、前記〔10〕～〔13〕いずれか記載のポリペプチド又はその一部を含有してなるワクチン、

〔20〕 ポリペプチドの一部が、連続した5個以上のアミノ酸残基からなるペプチド断片である前記〔19〕記載のワクチン、

〔21〕 前記〔10〕～〔13〕いずれか記載のポリペプチド又はその一部を含有してなる、バクテロイデス・フォーサイサスによる疾患の診断薬、

【0011】〔22〕 ポリペプチドの一部が、連続した5個以上のアミノ酸残基からなるペプチド断片である前記〔21〕記載の診断薬、

〔23〕 前記〔1〕～〔9〕いずれか記載のDNA又



はその一部を含有してなる、バクテロイデス・フォーサイサスによる疾患の診断薬、

〔24〕 前記〔17〕又は〔18〕記載の抗体を含有してなる、バクテロイデス・フォーサイサスによる疾患の診断薬、に関するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

(A) 本発明のDNAについて

本発明のDNAは、バクテロイデス・フォーサイサス由来の菌体外プロテアーゼをコードするDNAであれば、特に限定されない。本明細書において、バクテロイデス・フォーサイサスとしては、バクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株やFDC291株、FDC293株等が好ましいものとして挙げられる。本発明のDNAとしては、具体的には、以下のDNAが例示できる。

【0013】1) バクテロイデス・フォーサイサスの染色体DNAから得られ得るDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

2) 配列表の配列番号：1に示される塩基配列からなるDNA。

3) 配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNA。

【0014】2) のDNAに関して、配列表の配列番号：1に示される塩基配列の一部を有するDNAであってプロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、配列表の配列番号：1に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであってプロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、及び配列表の配列番号：1に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、付加、挿入又は置換されたDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNAも本発明のDNAに含まれる。

【0015】ここで、配列表の配列番号：1に示される塩基配列からなるDNAは、バクテロイデス・フォーサイサスの染色体DNAから得られるDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドのオープンリーディングフレームである。また、本明細書において、塩基配列の「一部」とは、例えば5～1271個の塩基をいう。

【0016】また、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」とは、ハイブリダイゼーションバッファーとして、5×SSC、5×デンハルト、0.1% SDS、250μg/mLサケ精子DNA含有50mMリン酸バッファー(pH6.5)を用い、ハイブリダイズ温度が50℃、6×SSC(室温)で1時間及び2×SSC、0.1%SDS(50℃)で5分間の洗浄を行

う、という条件でハイブリダイズすることを言う。また、塩基の欠失、付加、挿入又は置換数について、「数個」とは、例えば1～5個をいう。

【0017】また、3) のDNAに関して、配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドをコードするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNA、及び配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入又は置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするDNAであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドをコードするDNAも本発明のDNAに含まれる。

【0018】ここで、配列表の配列番号：2に示されるアミノ酸配列は、配列番号：1に示される塩基配列によってコードされるアミノ酸配列であり、バクテロイデス・フォーサイサス由来の新規の菌体外プロテアーゼのアミノ酸配列の一例である。

【0019】本発明のDNAにコードされるポリペプチドは、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するものである。ポリペプチドについてのかかる活性についての説明は、本発明のポリペプチドの箇所にて説明する。

【0020】本発明のDNAは、バクテロイデス・フォーサイサスから公知の方法でゲノムライブラリーを作製し、該ライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる。クローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))等の基本書に基づいて、当業者が容易に行うことができる。また、クローニングされたDNAの塩基配列の決定は、市販のシーケンスキット等を用いる公知の方法により行うことができる。アミノ酸配列や塩基配列に、欠失、付加、挿入又は置換といった変異を導入することは、例えば部位特異的突然変異誘発法等により、当業者であれば容易に行うことができる。

【0021】このような本発明のDNA(プロテアーゼ遺伝子)は、歯周病の病原因子として注目されているプロテアーゼをコードするものであり、歯周病に係わる診断、治療、研究のために有用である。

【0022】(B) 本発明のポリペプチドについて  
本発明のポリペプチドは、バクテロイデス・フォーサイサスから得られる菌体外プロテアーゼであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドであれば、特に限定されない。ここで、バクテロイデス・フォーサイサスとしては、バクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株やFDC291株、FDC293株等が好ましいものとして挙げられる。本発明のポリペプチドとしては、具体的には、以下のポリペプチドが例示できる。

【0023】1) バクテロイデス・フォーサイサスの染色体DNAから得られ得るDNAにコードされるポリペ

プチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド。

2) 配列表の配列番号: 2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

3) 配列表の配列番号: 1に示される塩基配列からなるDNAにコードされるポリペプチド。

【0024】2)のポリペプチドに関して、配列表の配列番号: 2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入又は置換されたポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド、及び配列表の配列番号: 2に示されるアミノ酸配列の一部を有するポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。

【0025】本明細書において、アミノ酸残基の欠失、付加、挿入又は置換について、「数個」とは、例えば1〜5個をいう。また、本明細書において、アミノ酸配列の「一部」とは、例えば5以上の残基をいう。また、配列番号: 2に示されるアミノ酸配列から、本発明のポリペプチドの分子量は約48kDaと計算から求められる。

【0026】3)のポリペプチドに関して、配列表の配列番号: 1に示される塩基配列の一部を有するDNAにコードされるポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド、配列表の配列番号: 1に示される塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAにコードされるポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチド、及び配列表の配列番号: 1に示される塩基配列において、1若しくは数個の塩基が欠失、付加、挿入又は置換されたDNAにコードされるポリペプチドであって、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドも、本発明のポリペプチドに含まれる。

【0027】本発明のポリペプチドは、プロテアーゼ活性及び溶血活性を有するものである。本明細書において、「溶血活性」とは、赤血球膜に作用してこれを崩壊させ、ヘモグロビンを遊離させる活性をいい、かかる活性は、具体的にはKimizukaらの方法(Microbiology and Immunology (96) 40: 717-723)に従って測定することができる。

【0028】即ち、測定対象のポリペプチド又はポリペプチド含有物をリン酸バッファー(0.8重量%塩化ナ

トリウム、0.02重量%塩化カルシウム、0.115重量%リン酸一水素ナトリウム(無水)、及び0.02重量%リン酸二水素カリウム(無水)(pH7.5))中に溶かし、試料溶液を調製する。次いで、予め同リン酸バッファーで遠心洗浄したヒトの血液と、該試料溶液を等容量混合し、37℃で1時間静置する。静置後、混合液の上清について、541nmの吸光度を測定する。試料溶液の代わりにサポニン液(サポニン(ナカライテスク社製サポニン)の同リン酸バッファー溶液、サポニンの濃度0.1重量%)および同リン酸バッファーでそれぞれ同様の操作を行い、それぞれの541nmの吸光度を測定する。サポニン液を用いた時の吸光度からリン酸バッファーを用いた時の吸光度を引き、その値に0.5を掛けた値を1溶血活性単位(HU)とする。ポリペプチド又はポリペプチド含有物1mgあたり1HU以上の活性を有するものを、「溶血活性を有するポリペプチド又はポリペプチド含有物」とする。

【0029】また、「プロテアーゼ活性」とは、ペプチド結合を加水分解する活性をいい、本明細書においては、以下の方法で測定することができる。即ち、測定対象のポリペプチド又はポリペプチドの含有物を、50mMトリスバッファー(pH8.0)に溶解させ、試料溶液を調製する。次いで、該試料溶液、N-ベンゾイル-L-Val-Gly-Arg-p-ニトロアニリド等の合成基質、及び同トリスバッファーを混合し、37℃で1時間インキュベートする。そして、インキュベート後の混合物について、405nmの吸光度を測定する。試料溶液の代わりに同トリスバッファーを用いたものを対照とする。対照の吸光度よりも高い値が出たものを、「プロテアーゼ活性が有る」とする。なお、溶血活性及びプロテアーゼ活性の測定に関して、測定対象のポリペプチドの含有物としては、例えば本発明のポリペプチドをコードするDNAが含有されてなる形質転換体の抽出物(例えば、菌表層抽出物等)が挙げられる。

【0030】本発明のポリペプチドは、以下の性質を有するプロテアーゼである。

基質特異性

種々の合成基質を用いての、公知のプロテアーゼ活性測定法により、本発明のポリペプチドは表1に示す基質特異性を有するものであることが分かる。

【0031】

【表1】

| 合成ペプチド                     | 活性 (%) ± SD |            |
|----------------------------|-------------|------------|
|                            | 実施例         | 対照         |
| N-Benzoyl Val-Gly-Arg- pNa | 100         | 0.4 ± 0.2  |
| BAPNA                      | 1.5 ± 0.7   | 1.3 ± 0.1  |
| L-Phe-Ala- pNa             | 2.7 ± 0.2   | 3.0 ± 0.6  |
| Gly-Phe- pNa               | 2.9 ± 0.4   | 2.6 ± 0.04 |
| Gly-Pro- pNa               | 0.3 ± 0.5   | 0.1 ± 0.1  |
| Ala-Ala-Phe- pNa           | 1.6 ± 0.3   | 1.4 ± 0.3  |
| N-Suc-Gly-Gly-Phe- pNa     | 2.0 ± 0.1   | 1.1 ± 0.5  |
| N-Suc-Ala-Ala-Ala- pNa     | 2.1 ± 0.4   | 1.3 ± 0.6  |
| N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe- pNa | 1.4 ± 0.5   | 0.9 ± 0.5  |
| N-Suc-Ala-Ala-Pro-Leu- pNa | 1.4 ± 0.1   | 1.2 ± 0.1  |
| N-Benzoyl-L-Tyro- pNa      | 1.0 ± 0.03  | 1.3 ± 0.3  |
| Glu-L-Phe-Ala- pNa         | 0.5 ± 0.04  | 0.6 ± 0.2  |
| N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg- pNa | 1.1 ± 0.2   | 0.3 ± 0.1  |
| N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg- pNa | 1.2 ± 0.3   | 1.4 ± 0.6  |

【0032】各種プロテアーゼインヒビターにより与えられる影響

本発明のポリペプチドは、TLCK、ロイペプチン、N-エチルマレイミド、ヨード酢酸、ヨードアセトアミド、及びEDTAでそのプロテアーゼ活性が阻害される。このことから、該ポリペプチドはシステインプロテアーゼであることが分かる。

【0033】本発明のポリペプチドは、本発明のDNAが挿入された発現ベクターが導入された細胞を培養し、得られるプロテアーゼ活性及び溶血活性を有するポリペプチドを回収することにより得ることができる。また、生産されたポリペプチドは、通常のカラムクロマトグラフィー又は後述の本発明の抗体を用いたアフィニティー精製等の公知のタンパク質の精製方法により容易に精製して回収することができる。

【0034】本発明の発現ベクターの構築に用いられるベクターは、例えば、pET、pCDM8、pBluescript SKII+等の公知のベクターが挙げられるが、本発明のDNAが挿入でき発現可能なベクターであれば特に限定されない。また、本発明のDNAをベクターに挿入する方法は特に限定されるものではなく、T4DNAリガーゼを用いる方法等の公知の方法を用いることができる。形質転換体である、本発明の細胞は、前記発現ベクターを所望の宿主細胞に導入することにより得られる。宿主細胞としては、原核生物細胞または真核生物細胞のいずれでもよく、用いる発現ベクターに応じて選ばれる。発現ベクターを導入する方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、CaCl<sub>2</sub>法、DEAE デキストラン法、エレクトロポレーション法等の公知の方法を用いればよい。

【0035】このような本発明のポリペプチドは、歯周病に係わる診断、治療、研究のために有用である。

【0036】(C) 本発明の抗体について

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド又はその一部に特異的に結合する抗体であればポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれでも構わない。かかる抗体は、例えば特開平7-97395号公報に記載された方法に従って、本発明のポリペプチドの全部又は一部を用いてウサギやマウス等を免疫することにより、容易に生産することができる。かかる抗体の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、cDNAライブラリーのスクリーニング、医薬・診断薬・実験用試薬等が挙げられる。

【0037】抗体の産生のためのポリペプチドは、本発明のDNAが導入された形質転換体の培養物から精製することができる。また、ポリペプチドの一部であるペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、公知のペプチド合成法により得ることができる。

【0038】ポリペプチドの一部からなるペプチド断片としては、該断片に対する抗体が該ポリペプチド又はその一部に特異的に結合するものであれば特に限定されない。ポリペプチドの一部としては、例えば本発明のポリペプチドにおける連続した5個以上のアミノ酸残基からなるペプチド断片が挙げられる。そのようなペプチド断片としては、例えば配列番号：2で示されるアミノ酸配列のN末端の1位～377位の範囲におけるアミノ酸配列を有するペプチド断片が好ましく、1位～190位の範囲におけるアミノ酸配列を有するペプチド断片がより好ましい。かかるペプチド断片としては、例えば、配列表の配列番号：3～配列番号：5に示されるアミノ酸配列を有するペプチド断片が挙げられる。

【0039】また、本発明においては、抗体の産生やワクチン・診断薬に用いるポリペプチドの一部としてのペプチド断片として、下記に述べるペプチド断片の誘導体、ペプチド断片の塩、又は該誘導体の塩を用いること



ができる。即ち、本発明において、下記のペプチド断片、ペプチド断片の誘導体、ペプチド断片の塩、又は該誘導体の塩の誘導体はポリペプチドの一部に包含される。

【0040】本明細書においてペプチド断片の誘導体とは、ペプチド断片に、保護基、官能基、スペーサー又は担体等を結合させたものをいう。例えば、ペプチド断片のN末端がアセチル基またはウレタン基等で保護されたものや、C末端がアミド基またはエステル基等で保護されたものが、保護基を有する誘導体の例である。また、ペプチド断片にチロシンやシステインを導入したのも誘導体に包含される。更に、抗体がペプチド断片に結合する場合に、立体障害をうけにくくする目的でスペーサーを導入しても良いが、このようなスペーサーが導入されたものも誘導体に包含される。

【0041】担体が結合した誘導体としては、ポリリジン、各種ポリマー、ウシ血清アルブミン、テタヌストキソイド、オボアルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、サイログロブリン、γ-グロブリン、多糖等が結合したものが包含される。

【0042】ペプチド断片の塩またはペプチド断片誘導体の塩としては、ペプチド断片自体またはその誘導体がアミノ基を有する場合には、それと造塩作用のある塩酸、硫酸、リン酸、ピロリン酸等の無機酸との塩、さらには酢酸、乳酸、パルミチン酸、ステアリン酸、プロピオン酸、クエン酸、酒石酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、シュウ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸との塩等の酸付加塩が挙げられる。

【0043】一方、ペプチド断片自体またはその誘導体がカルボキシル基、スルホニル基をもつ場合には、それらのナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩等の塩が挙げられる。

【0044】ペプチド断片の誘導体は、ペプチド化学の技術分野で通常用いられる化学的修飾手段によって得ることができる。例えば、ペプチド断片へ担体を化学結合させる場合には、グルタルアルデヒド、水溶性カルボジイミド、スクシンイミド等を用いる方法が利用できる。

【0045】(D) 本発明のワクチンについて  
本発明のワクチンは、上記に記載の本発明のポリペプチド又はその一部を有効成分として含有してなるものであって、個体に投与してバクテロイデス・フォーサイサスに対する感染防御免疫を誘導する活性を有するものである。本発明のワクチンに用いられるポリペプチドの一部からなるペプチド断片としては、本発明の抗体の説明の箇所で記載したペプチド断片と同じものが好ましいものとして挙げられる。

【0046】本発明のワクチンには、別の構成成分とし

て、例えば、水、塩溶液、グルコースまたはグリセリンを配合しても良い。更にワクチンには、吸収促進剤として、胆汁酸またはその誘導体もしくはそれらの塩、界面活性剤、コレラトキシンBサブユニットなどを配合しても良い。

【0047】さらに、その他の成分として、ミョウバン、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、硫酸アルミニウム、ムラミルジペプチドなどのアジュバント；オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸などのアジュバント脂溶性成分；ソルビン酸、クロロブタノール、安息香酸、パラオキシ安息香酸エステル、ホウ酸、デヒドロ酢酸、チモール等の防腐剤；ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カラギーナン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム、キサンタンガム、モンモリロナイト、カオリン、水和シリカ、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、ヘクトライトなどの粘結剤を配合することができる。ワクチンの投与方法としては、皮下注射、筋肉注射、口腔内注射、静脈注射、経鼻投与、経口投与、経口腔粘膜投与等の方法が挙げられる。

【0048】さらに、いわゆる受動免疫として、本発明のポリペプチド又はその一部をウシや鶏に免疫して得られる、血清、牛乳、卵に含まれる特異抗体を含有する口腔用組成物を歯周病予防や治療に用いることができる。代表的な初回投与量は、タンパク質量として0.1～1.0mg/kg体重であるが、必要とする予防又は治療の程度に応じて、投与量を増加したり、投与回数を増大させればよい。

【0049】(E) 本発明の疾患の診断薬について  
本発明のポリペプチド若しくはその一部、本発明のDNA若しくはその一部、又は本発明の抗体を含有したものは、歯周病等の疾患の診断薬として利用することができる。例えば、本発明のポリペプチド又はその一部を含有してなる診断薬を用いる場合、本発明のポリペプチド又はその一部をポリスチレンプレート、ガラスフィルター、磁性粒子、ラテックス等に固定化し、標識二次抗体で被験者の特異抗体を検出するELISA法、RIA法、蛍光抗体法、化学発光抗体法等を利用して歯周病を診断できる。本発明の診断薬に用いられるポリペプチドの一部からなるペプチド断片としては、本発明の抗体の説明の箇所で記載したペプチド断片と同じものが好ましいものとして挙げられる。

【0050】また、本発明のDNA又はその一部を含有してなる診断薬を用いる場合、プローブとしての該DNA又はその一部、及び被験者由来の唾液、歯垢、歯肉溝液等から得られるDNAを用いるサザンブロット法等を利用して歯周病を診断できる。

【0051】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説

明するが、本発明はこれらの実施例等によりなんら限定されるものではない。

【0052】実施例1（プロテアーゼ遺伝子のクローニング）

バクテロイデス・フォーサイサスのプロテアーゼ遺伝子のクローニングは、Ishiharaらの方法（Infection and Immunity (95) 63: 1147-1152）に従って行った。即ち、バクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株から、染色体DNAをフェノールで抽出後、エタノールで沈殿させた。得られた染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分消化し、10～40%のショ糖密度勾配遠心分離（154000×g、18時間）により、2～10kbpのDNAフラグメントを得た。それらのフラグメントをプラスミドベクター pBluescript SKII+に組込み、この発現ベクターをCaCl<sub>2</sub>法により大腸菌HB101に導入した。形質転換された大腸菌HB101を1重量%スキムミルクおよび60μg/mLアンピシリンを含むLB寒天培地で生育させ、コロニーの周囲に透明斑を作ったものをポジティブクローンとした。

【0053】ポジティブクローンから得られるプラスミドを鋳型として、またSKプライマーをプライマーとして、ダイプライマーシーケンスキット（Applied Biosystem社製）を用いて、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法によって、自動DNAシーケンサー（Applied Biosystem社製、model 373A）で塩基配列を決定した。

【0054】このようにして得られた、バクテロイデス・フォーサイサスの菌体外プロテアーゼのオープンリーディングフレームの塩基配列を、配列表の配列番号：1に示す。また、配列番号：1に示される塩基配列にコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

【0055】実施例2（組換えプロテアーゼの生産）  
実施例1で得たポジティブクローンを、60μg/mLアンピシリンを含むLBブロスで培養した。得られた菌体を超音波破碎後、遠心分離して上清を得た。この上清から、硫酸アンモニウムによる沈殿法でタンパク質を濃縮した。得られたタンパク質から、ロトフォア・セル（Bio-Rad Laboratories社製）を用いて、isoelectric focusingによって活性フラクションを得、プロテアーゼを部分精製した。活性フラクションから、Superdex 200 HR（Pharmacia社製）ゲルろ過カラムを用いて組換えプロテアーゼを精製した。

【0056】次に、形質転換された大腸菌由来の、本発明のポリペプチドのプロテアーゼ活性及び基質特異性について調べた。形質転換された大腸菌HB101の菌表面層抽出物50μL、表1に示す合成基質50μL、50mMトリスバッファー（pH8.0）150μLを37℃で1時間インキュベートし、混合物の405nmの吸光度を測定した。結果を表1に示す。表1において、

各合成基質に対する活性値は、N-ベンゾイル-L-Val-Gly-Arg-p-ニトロアニリドの吸光度を100（%）として示した。

【0057】また、形質転換を行っていない大腸菌HB101の菌表面層抽出物についても、同様に実験を行った。このデータは対照とした。その結果、クローニングしたプロテアーゼは、N-ベンゾイル-L-Val-Gly-Arg-p-ニトロアニリドに特異的なプロテアーゼであることが分かった。

【0058】また、形質転換した大腸菌HB101の菌表面層抽出物に含有されるポリペプチドについて、各種プロテアーゼインヒビターが与える影響を調べた。その結果、該ポリペプチドは、TLCK、ロイペプチン、N-エチルマレイミド、ヨード酢酸、ヨードアセトアミド、及びEDTAでそのプロテアーゼ活性が阻害された。このことから、該ポリペプチドはシステインプロテアーゼであることが分かった。

【0059】形質転換された大腸菌HB101を超音波破碎して菌表面層抽出物を得た。このようにして得られた菌表面層抽出物400μLと、リン酸バッファー（0.8重量%塩化ナトリウム、0.02重量%塩化カルシウム、0.115重量%リン酸一水素ナトリウム（無水）、及び0.02重量%リン酸二水素カリウム（無水）（pH7.5））で遠心洗浄したヒトおよびウマの血液400μLを37℃で1時間インキュベートし、混合物の上清の541nmの吸光度を測定した。菌表面層抽出物の代わりに、サポニン液（サポニン（ナカライテスク社製サポニン）の同リン酸バッファー溶液、サポニンの濃度0.1重量%）、及び同リン酸バッファーでそれぞれ同様の操作を行い、サポニン液を用いた時の吸光度からリン酸バッファーを用いた時の吸光度を引き、その値に0.5を掛けた値を1溶血活性単位（HU）とした。

【0060】その結果、形質転換された大腸菌HB101の菌表面層抽出物は、ヒトおよびウマに対し、それぞれ14.2HU/mg、10.8HU/mgの溶血活性を示した。また、対照として用いた、形質転換していない大腸菌HB101の菌表面層抽出物はいずれの血液に対しても活性を示さず、0HU/mgであったことから、形質転換された大腸菌HB101の菌表面層抽出物には導入されたDNA由来のタンパク質である、本発明のポリペプチドが含有されていることが分かる。また、かかる溶血活性により歯周炎に関与していることが考えられる。

【0061】実施例3（抗体の生産）

特開平8-48695号公報に記載の方法に従い、CHIRON MIMOTOPES PTY LTD（オーストラリア）製のMULTI-PIN PEPTIDE SYNTHESIS KITを用いて、実施例1で得られた本発明のDNAの塩基配列から導かれるポリペプチドのアミノ酸配列を基に、5～15個のアミノ酸残基から



なる3種類のペプチドをN末端側から合成した。合成されたペプチドは、それぞれペプチド-1（アミノ酸配列は配列番号：3で示される。）、ペプチド-2（アミノ酸配列は配列番号：4で示される。）、ペプチド-3（アミノ酸配列は配列番号：5で示される。）とし、それぞれ配列番号：2で示されるアミノ酸配列の第44～48位（ペプチド-1）、第168～177位（ペプチド-2）、第363～377位（ペプチド-3）に該当する。

【0062】上記のペプチドをバイツカイチス（Vaitukaitis）ら（J. Clin. Endoch. 33:988（1971））の方法に従い、フロインド完全アジュバントで乳化し、5週令のBALB/cマウス5匹に、マウス体重1kgあたり100μgの量のペプチドを2週ごとに3回皮下注射した。最終免疫の1週間後に血液を採取し、ELISA法で抗体産生の有無を調べた。

【0063】ELISA法による測定は以下のように行った。バクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株を100μg（凍結乾燥菌体）/mLの濃度に調製し、菌体を96穴マイクロタイタープレートに固定化し、続いてブロッキングを行った。次いで、採取された血液を希釈した液をウェルに添加した。37℃で60分間放置後、ウェルを洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗マウス免疫グロブリン抗体を添加した。37℃で60分間放置後、ウェルを洗浄し、次いでウェルに200μLの二塩酸o-フェニレンジアミン（0.04重量%）と10μL/100mLの過酸化水素水（30%）を加え、490nmの吸光度を測定した。また、ペプチドの代わりにフロインド完全アジュバントのみを注射したマウスについても同様に処理を行い、血液を採取した。このものを対照とした。結果を表2に示す。

【0064】

【表2】

| アミノ酸配列          | 吸光度   |
|-----------------|-------|
| SPDRTW          | 0.530 |
| YIIDDLMSA       | 0.602 |
| NGTTNNSKLMKITDA | 0.621 |
| 対照              | 0.1以下 |

【0065】表2より、本発明のポリペプチドの一部により、バクテロイデス・フォーサイサスに特異的な抗体が生産されることが分かった。このことから、本発明のポリペプチド又はその一部をワクチンとして利用し得ることが示された。

【0066】実施例4（ワクチンとしての利用）

本発明のポリペプチド又はその一部の必要量を取り、等容量の不完全フロイントアジュバント又は完全フロイントアジュバントと十分に混合し、油中水系のワクチン製剤を得る。

【0067】実施例5（診断薬としての利用）

実施例3で合成したペプチドを、常法に従って96穴マイクロタイタープレートに固定化した。歯周病患者及び健常者の血清をリン酸緩衝液で希釈し、ペプチドを固定化したウェルに添加した。ウェルを洗浄した後、二次抗体として市販のパーオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒトIgG抗体を希釈して加え、37℃でインキュベートした。次いでウェルを洗浄後、o-フェニレンジアミン溶液をウェルに添加して405nmの吸光度を測定した。また、血清の希釈液の代わりに等量のPBSを添加して、同様の操作を行ったものを「検体無添加」とした。結果を表3に示す。

【0068】

【表3】

| アミノ酸配列          | 吸光度   |       |
|-----------------|-------|-------|
|                 | 歯周病患者 | 健常者   |
| SPDRTW          | 0.628 | 0.264 |
| YIIDDLMSA       | 0.607 | 0.351 |
| NGTTNNSKLMKITDA | 0.674 | 0.298 |
| 検体無添加           | 0.1以下 | 0.1以下 |

【0069】表3より、健常者と歯周病患者との間の吸光度の差は顕著なものであることが分かった。したがって、本発明のペプチドは歯周病の診断薬として利用されることが分かった。

【0070】実施例6（本発明のDNAを用いてのサザンハイブリダイゼーション）

バクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株、臨床分離株3株、及びボルフィロモナス・ジンジバリス（コントロールとして）を、Sau3A.Iで部分消化し、アガロースゲル電気泳動に付した。泳動ゲルを1.5M塩化ナトリウム/0.5N水酸化ナトリウム水溶液でアルカリ変性させた後、トリスバッファーで中和し、ナイロンフィルターに転写させた。

【0071】このナイロンフィルターに、1～10pmolのディゴキシゲニンでラベルしたプラスミドプローブをハイブリダイズさせ、42℃で一晩インキュベートした。ナイロンフィルターを洗浄後、抗ディゴキシゲニン-アルカリフォスファターゼコンジュゲート抗体を添加し、インキュベートした後発色試薬を用いて発色させた。

【0072】プラスミドプローブは次のようにして作製した。DIG DNA ラベリングシステム（ベリンガーマンハイム社製）を用いて、DIG-dUTPで、本発明のポリペプチドをコードするDNAが挿入されたプラスミドベクター pBluescript SKII+をラベルした。このものをプラスミドプローブとした。

【0073】また、ハイブリダイズは次のようにして実

施した。50%ホルムアミド、5×SSC、1%ブロッキングバッファー、0.1%サルコシン、0.01%SDSを含むハイブリダイズバッファーで、42℃、18時間インキュベートした。また、検出は、ハイブリダイズしたナイロンフィルターを洗浄後、DIG DNAディテクションキット（ベーリンガー・マンハイム社製）を用いて実施した。

【0074】その結果、バクテロイデス・フォーサイサスATCC43037株、臨床分離株3株はそれぞれ0.6kbp、0.8kbpの位置にバンドを形成した。また、ポルフィロモナス・ジンジバリスにはバンドが見られなかった。このことから、本発明のDNAはバクテロイデス・フォーサイサスの検出、歯周病の診断に有用であることが分かった。

配列：

|   |     |
|---|-----|
| ATG GCT CCA ATG GGA GCT GTA TGG GAT GAC CGA TCT TTG GCG CTA | 45  |
| Met Ala Pro Met Gly Ala Val Trp Asp Asp Arg Ser Leu Ala Leu |     |
| 1 5 10 15   |     |
| TCA TCT AAG ATG GCT TTT GCC AAT GAG AAG TTG AGA TAT CTG TTT | 90  |
| Ser Ser Lys Met Ala Phe Ala Asn Glu Lys Leu Arg Tyr Leu Phe |     |
| 20 25 30  |     |
| TGG TCA ACT TGT CTC AGT TTA AGA GTC CAC GAT GGA CAT TCT CCT | 135 |
| Trp Ser Thr Cys Leu Ser Leu Arg Val His Asp Gly His Ser Pro |     |
| 35 40 45  |     |
| GAT CGT ACC TGG CGA CTT GCC AAT AAA GGA GGG TTG AGG ATG ATC | 180 |
| Asp Arg Thr Trp Arg Leu Ala Asn Lys Gly Gly Leu Arg Met Ile |     |
| 50 55 60  |     |
| TTT GGT TAT GAA ACG GTA TCT TAT GAC AGT GGC CGC TAT GGC AGT | 225 |
| Phe Gly Tyr Glu Thr Val Ser Tyr Asp Ser Gly Arg Tyr Gly Ser |     |
| 65 70 75  |     |
| GAA TTT TGG AAA CAA TGG AAA AAA GGA AAG AGT TTT TCT GAT GCT | 270 |
| Glu Phe Trp Lys Gln Trp Lys Lys Gly Lys Ser Phe Ser Asp Ala |     |
| 80 85 90  |     |
| TTT ATT GAA GCC AGT TGG TCG CTA TTC CGG AAT CAA ACG CCC GTC | 315 |
| Phe Ile Glu Ala Ser Trp Ser Leu Phe Arg Asn Gln Thr Pro Val |     |
| 95 100 105  |     |
| GTT TGT GCA TGT GGC AAT ACT AAA GAG GAG GTT CAA AAA AGG CTG | 360 |
| Val Cys Ala Cys Gly Asn Thr Lys Glu Glu Val Gln Lys Arg Leu |     |
| 110 115 120   |     |
| TTT TCG GAA AGA ATG TTC TAT TCC GGG GCG GTG AGC AGC AAC TGG | 405 |
| Phe Ser Glu Arg Met Phe Tyr Ser Gly Ala Val Ser Ser Asn Trp |     |
| 125 130 135   |     |
| TAT TGG TGG AAG TGG AGA GAG GCC CAA AAC CAT AAA GGC CTT AAG | 450 |
| Tyr Trp Trp Lys Trp Arg Glu Ala Gln Asn His Lys Gly Leu Lys |     |
| 140 145 150   |     |
| ACA GCA AGA GCG AAG GCC CTT CAA AAT ATG GAT GTG TTG CTC TTG | 495 |
| Thr Ala Arg Ala Lys Ala Pro Gln Asn Met Asp Val Leu Leu Leu |     |
| 155 160 165   |     |
| AAA CCG TAC ATA ATT GAC GAT GAT TTG ATG TCA GCA ATT GCA AAT | 540 |
| Lys Pro Tyr Ile Ile Asp Asp Asp Leu Met Ser Ala Ile Ala Asn |     |

【0075】

【発明の効果】本発明のDNA、該DNAにコードされるポリペプチドは、歯周病に関する診断、治療、研究のために有用なものである。また、本発明のワクチン、診断薬は歯周病の予防、治療、診断に有用なものである。

【0076】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1272

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

|   |     |     |      |
|---|-----|-----|------|
| 170   | 175 | 180 |      |
| AAA GTC GGC ATC AAC AAA ATA ACG GCA AAA TCG ATT GCT ATC GGA |     |     | 585  |
| Lys Val Gly Ile Asn Lys Ile Thr Ala Lys Ser Ile Ala Ile Gly |     |     |      |
| 185   | 190 | 195 |      |
| CAA GAT GGT TTA CGT TGT ATC GGA ACA AAA GAC ATT TTG GTA AGT |     |     | 630  |
| Gln Asp Gly Leu Arg Cys Ile Gly Thr Lys Asp Ile Leu Val Ser |     |     |      |
| 200   | 205 | 210 |      |
| GTG GAT TCT TCA GGG ACG CTG CAA TTA CAA ATG GCT CAG GCT AAT |     |     | 675  |
| Val Asp Ser Ser Gly Thr Leu Gln Leu Gln Met Ala Gln Ala Asn |     |     |      |
| 215   | 220 | 225 |      |
| TAT CGG AAT GAC AAC CGG ATC AGC GAA ATC CAA GCA ACC AAG ATT |     |     | 720  |
| Tyr Arg Asn Asp Asn Arg Ile Ser Glu Ile Gln Ala Thr Lys Ile |     |     |      |
| 230   | 235 | 240 |      |
| GCC AGA GAA TTG ATT GAA GAT TTG GGA ATT GCC AAG GAT GTC AAA |     |     | 765  |
| Ala Arg Glu Leu Ile Glu Asp Leu Gly Ile Ala Lys Asp Val Lys |     |     |      |
| 245   | 250 | 255 |      |
| TTG ACA CCG GCA ACT ACG TAT AAC TCG TTC CTG TGT GGT GCC AAT |     |     | 810  |
| Leu Thr Pro Ala Thr Thr Tyr Asn Ser Phe Leu Cys Gly Ala Asn |     |     |      |
| 260   | 265 | 270 |      |
| ACG AAA ACT GGC GAG CAG GGT AAG CCA ACG GTG GTA GAG ACT ATT |     |     | 855  |
| Thr Lys Thr Gly Glu Gln Gly Lys Pro Thr Val Val Glu Thr Ile |     |     |      |
| 275   | 280 | 285 |      |
| ATT CAG TTC CGC CAA GTC AAT GAC AAA ATG GAA AGT GTG AAT GCA |     |     | 900  |
| Ile Gln Phe Arg Gln Val Asn Asp Lys Met Glu Ser Val Asn Ala |     |     |      |
| 290   | 295 | 300 |      |
| GAT TCC GGT TTC GTT GCA GTC GCT GTT GAC AAC GAC GGA AAG ATC |     |     | 945  |
| Asp Ser Gly Phe Val Ala Val Ala Val Asp Asn Asp Gly Lys Ile |     |     |      |
| 305   | 310 | 315 |      |
| ACA CGT CTA ACC AGC TCC GTC AAA CCA ATT GTA GAT ACC CAA AAG |     |     | 990  |
| Thr Arg Leu Thr Ser Ser Val Lys Pro Ile Val Asp Thr Gln Lys |     |     |      |
| 320   | 325 | 330 |      |
| AGT ATT GAT ATG CAG AGC CTT GCT AAA AAG AGG GAG GTC AAA ATG |     |     | 1035 |
| Ser Ile Asp Met Gln Ser Leu Ala Lys Lys Arg Glu Val Lys Met |     |     |      |
| 335   | 340 | 345 |      |
| AAG GAG CTT TCT GTC GAA GAA CGA TTC GAA AGA AAG ATC AAT CGC |     |     | 1080 |
| Lys Glu Leu Ser Val Glu Glu Arg Phe Glu Arg Lys Ile Asn Arg |     |     |      |
| 350   | 355 | 360 |      |
| TTG ATA AAC GGA ACG ACA AAC AAC AGC AAG TTG ATG AAG ATA ACA |     |     | 1125 |
| Leu Ile Asn Gly Thr Thr Asn Asn Ser Lys Leu Met Lys Ile Thr |     |     |      |
| 365   | 370 | 375 |      |
| GAT GCC CCA AAG GTA ATG GTC GAA ACA CTC TCC GAT AAA ATC GGG |     |     | 1170 |
| Asp Ala Pro Lys Val Met Val Glu Thr Leu Ser Asp Lys Ile Gly |     |     |      |
| 380   | 385 | 390 |      |
| TAT GAC TTC TCT TCC AAC TAT GCC CAA CCG GTC CAG CAG CGT GAT |     |     | 1215 |
| Tyr Asp Phe Ser Ser Asn Tyr Ala Gln Pro Val Gln Gln Arg Asp |     |     |      |
| 395   | 400 | 405 |      |
| ATC GAA ATC AAA GTG GGC GAT TTT GTA AAA CGC TAC CAA TTG AGA |     |     | 1260 |
| Ile Glu Ile Lys Val Gly Asp Phe Val Lys Arg Tyr Gln Leu Arg |     |     |      |
| 410   | 415 | 420 |      |
| GTA GAT TTG TAA   |     |     | 1272 |



Val Asp Leu

【 0 0 7 7 】 配列番号 : 2

配列の長さ : 4 2 3

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ala | Pro | Met | Gly | Ala | Val | Trp | Asp | Asp | Arg | Ser | Leu | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Ser | Lys | Met | Ala | Phe | Ala | Asn | Glu | Lys | Leu | Arg | Tyr | Leu | Phe |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |
| Trp | Ser | Thr | Cys | Leu | Ser | Leu | Arg | Val | His | Asp | Gly | His | Ser | Pro |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |
| Asp | Arg | Thr | Trp | Arg | Leu | Ala | Asn | Lys | Gly | Gly | Leu | Arg | Met | Ile |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |
| Phe | Gly | Tyr | Glu | Thr | Val | Ser | Tyr | Asp | Ser | Gly | Arg | Tyr | Gly | Ser |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |
| Glu | Phe | Trp | Lys | Gln | Trp | Lys | Lys | Gly | Lys | Ser | Phe | Ser | Asp | Ala |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |
| Phe | Ile | Glu | Ala | Ser | Trp | Ser | Leu | Phe | Arg | Asn | Gln | Thr | Pro | Val |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |
| Val | Cys | Ala | Cys | Gly | Asn | Thr | Lys | Glu | Glu | Val | Gln | Lys | Arg | Leu |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |
| Phe | Ser | Glu | Arg | Met | Phe | Tyr | Ser | Gly | Ala | Val | Ser | Ser | Asn | Trp |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |
| Tyr | Trp | Trp | Lys | Trp | Arg | Glu | Ala | Gln | Asn | His | Lys | Gly | Leu | Lys |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |     |
| Thr | Ala | Arg | Ala | Lys | Ala | Pro | Gln | Asn | Met | Asp | Val | Leu | Leu | Leu |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |     |
| Lys | Pro | Tyr | Ile | Ile | Asp | Asp | Asp | Leu | Met | Ser | Ala | Ile | Ala | Asn |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |     |
| Lys | Val | Gly | Ile | Asn | Lys | Ile | Thr | Ala | Lys | Ser | Ile | Ala | Ile | Gly |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |     |
| Gln | Asp | Gly | Leu | Arg | Cys | Ile | Gly | Thr | Lys | Asp | Ile | Leu | Val | Ser |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |     |
| Val | Asp | Ser | Ser | Gly | Thr | Leu | Gln | Leu | Gln | Met | Ala | Gln | Ala | Asn |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |     |
| Tyr | Arg | Asn | Asp | Asn | Arg | Ile | Ser | Glu | Ile | Gln | Ala | Thr | Lys | Ile |
|     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| Ala | Arg | Glu | Leu | Ile | Glu | Asp | Leu | Gly | Ile | Ala | Lys | Asp | Val | Lys |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Leu | Thr | Pro | Ala | Thr | Thr | Tyr | Asn | Ser | Phe | Leu | Cys | Gly | Ala | Asn |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |
| Thr | Lys | Thr | Gly | Glu | Gln | Gly | Lys | Pro | Thr | Val | Val | Glu | Thr | Ile |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |
| Ile | Gln | Phe | Arg | Gln | Val | Asn | Asp | Lys | Met | Glu | Ser | Val | Asn | Ala |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |
| Asp | Ser | Gly | Phe | Val | Ala | Val | Ala | Val | Asp | Asn | Asp | Gly | Lys | Ile |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |
| Thr | Arg | Leu | Thr | Ser | Ser | Val | Lys | Pro | Ile | Val | Asp | Thr | Gln | Lys |
|     |     |     |     | 320 |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |

```

Ser Ile Asp Met Gln Ser Leu Ala Lys Lys Arg Glu Val Lys Met
          335          340          345
Lys Glu Leu Ser Val Glu Glu Arg Phe Glu Arg Lys Ile Asn Arg
          350          355          360
Leu Ile Asn Gly Thr Thr Asn Asn Ser Lys Leu Met Lys Ile Thr
          365          370          375
Asp Ala Pro Lys Val Met Val Glu Thr Leu Ser Asp Lys Ile Gly
          380          385          390
Tyr Asp Phe Ser Ser Asn Tyr Ala Gln Pro Val Gln Gln Arg Asp
          395          400          405
Ile Glu Ile Lys Val Gly Asp Phe Val Lys Arg Tyr Gln Leu Arg
          410          415          420

```

Val Asp Leu

【 0 0 7 8 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ser Pro Asp Arg Thr Trp

1

5

【 0 0 7 9 】 配列番号 : 4

配列の長さ : 1 0

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

配列 :

Asn Gly Thr Thr Asn Asn Ser Lys Leu Met Lys Ile Thr Asp Ala

1

5

10

15

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Tyr Ile Ile Asp Asp Asp Leu Met Ser Ala

1

5

10

【 0 0 8 0 】 配列番号 : 5

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>

C 1 2 N 1/21

9/52

// (C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 N 9/52

C 1 2 R 1:19)

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 N 9/52

A 6 1 K 37/54

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] In diagnosis and the therapy of the important disease in dentistry, especially periodontosis, this invention relates to the antibody to a useful periodontopathic-bacteria origin enzyme, a measuring method for the same, and the enzyme concerned.

[0002]

[Description of the Prior Art] Periodontosis serves as the most important disease of the dentistry field in today's aging society. While desire of liking to eat a thing for one's gear tooth throughout life becomes increasingly strong, the periodontosis which causes dental loss is continuing increasing with age certainly. When advancing periodontal treatment, \*\*\*\* diagnosis and diagnosis which grasp symptoms are very important.

[0003] Now as a clinical parameter currently used for \*\*\*\* diagnosis or diagnosis The depth (probing depth) of (1) parodontal pocket, and the amount of loss of adhesion (attachment loss), (2) The index showing a dental oscillation degree and the inflammation state of (3) gum (gingival index), (4) Items, such as the amount of exudates (GCF volume) of the index (plaque index) showing the accumulation state of a dental plaque, the index (gingival bleeding index) showing (5) bleeding, the alveolar-bone-absorption state from (6) X rays, and (7) gingival sulci, are known.

[0004] However, these clinical parameters had left the problem in respect of the following, and were not enough satisfactory. First, although measurement of the depth of the parodontal pocket or the amount of loss of adhesion, the judgment of the grade of the alveolar bone absorption from an X ray, etc. are used widely as a useful clinical parameter for getting to know the grade of destruction of the periodontium which is the most important symptoms of periodontosis, These show the result of the periodontium destruction by the past inflammation to the last, and cannot serve as a key which gets to know the influence of activity, a tooth pulp, etc. on periodontium destruction in the actual condition.

[0005] A gingival index (gingival index), Plaque Index (plaque index), Although the grade of agitation of a bleeding index (gingival bleeding index) and a gear tooth, the amount of exudates of a gingival sulcus (GCF volume), etc. are the parameters reflecting present condition of disease, There was a difficulty that accuracy, reproducibility, and objectivity are missing as a clinical parameter for judging the necessity for diagnosis of the activity of the actual condition of periodontitis or a therapy which advances at a complicated step -- a judging standard is very rough or needs a special measuring device (GCF volume). Thus, the actual condition is that there is neither the objective diagnosis method nor an exact diagnosing method in diagnosis of periodontosis, etc., and this poses a global problem in the field concerned.

[0006] These days, By measuring two or more enzymes of the Porphyromonas gingivalis (Porphyromonas gingivalis) origin which is one of the periodontopathic bacteria using a



suitable substrate and/or activator. Although the method of diagnosing periodontosis is found out (international application published unexamined application; W092/07086), There is a fault, like the singularity and sensitivity of that specification of an enzyme is not made by the invention method concerned and the substrate used for measurement are low, The enzyme activity furthermore measured by these methods is unknown in how many influences are received by various inhibitor of living body origin (endogeneous inhibitors such as serpins and cystatins), As for the method concerned, when these enzymes were influenced by inhibitor, what has the exact amount of enzymes measured by the invention method concerned could not say, but was still insufficient for using for diagnosis of periodontosis.

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although it faces getting to know the advancing state of the condition of disease concerned objective about diagnosis of periodontosis, etc. judging how a subsequent therapy is performed and it is dramatically important, The method of still satisfying fully as mentioned above was not provided, but it was anxious for development of the method that the advancing state of periodontosis can be judged simple.

[0008]

[Means for Solving the Problem] When this invention persons were considering an operation in periodontosis of *P. gingivalis* (*P. gingivalis*) which is one of the periodontopathic bacteria, the biomass concerned was producing a new enzyme which is protease, and they found out this enzyme participating in periodontosis.

[0009] In proportion to progression of condition of disease of periodontosis, the above-mentioned enzyme activity went up in a periodontosis clinical patient's crevicular exudate, and this invention persons found out the new knowledge that a condition of periodontosis and a grade of an activity rise of the enzyme concerned had correlation.

[0010] Especially the enzyme concerned has the collagenase activity which decomposes strongly type I collagen which is a basic component of periodontium, A functional disorder is caused to inflammatory cells, such as causing direct destruction of periodontium, and neutrophil leucocyte, and a host defense system is destroyed, When a direction of measuring the enzyme concerned rather than measuring an enzyme of the *P. gingivalis* origin in which it becomes clear in which to have character to be closely related to the onset of periodontosis or advance, and a function, and it is known conventionally got to know progression of condition of disease of periodontosis, it found out that it is very significant.

[0011] It is completed based on the above-mentioned knowledge, and this invention provides said enzyme which *P. gingivalis* produces, and a detecting method of this enzyme.

[0012] An enzyme of this invention is *P. A* microorganism belonging to *gin JIBARISU* can be used, for example, it can obtain as follows. First, after cultivating a microorganism belonging to *P. gingivalis*, adding ammonium sulfate to the culture supernatant and considering it as saturation 70%, formed precipitate is collected by centrifugal separation or other means, and this is dialyzed to a phosphate buffer solution which contains a nonionic surfactant, for example. Subsequently, non-adsorbing fractionation obtained by applying centrifugal dialysis supernatant liquid to columns, such as DEAE Sephacel equilibrated with a phosphate buffer solution etc., is condensed, it applies to columns, such as CM \*\*TOYO pearl, further, and an activity fraction is eluted. After condensing and dialyzing an eluate fraction at the last, it can obtain as a refining enzyme by applying to isoelectric point separation of pH 3.5 to 10 range, and collecting activity fractions of pH 5.0-5.5, and also giving gel filtration, such as TSK gel G2000SW, after concentration and dialysis.

[0013] A new enzyme (protease) of this invention obtained thus has specific enzymology character as shown below.

[0014] (1) Operation; while having direct resolution to periodontium which makes collagen a subject, it has obstacle activity to inflammatory cells, such as neutrophil leucocyte. A

decomposition form of this enzyme is comparatively nonspecific, and acts as protease (Endoproteinase).

(2) Substrate specificity; while it has high resolution to various protein, such as collagen and an immunoglobulin, Quality t of a synthetic fluorescent group - Butyloxy carbonyl L-phenylalanyl L-seryl L-arginine 4-methylcoumaryl 7-amide (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA) and carbobenzoyl-L-phenylalanyl L-arginine 4-methylcoumaryl amide. (Z-Phe-Arg-MCA) etc. -- it has arginyl and peptidase (arginylendopeptidase) activity which are decomposed specifically.

[0015](3) Optimal pH and stable pH; as shown in drawing 1, in any [ of a protein substrate and a synthetic substrate ] case, be in 7-8, and optimal pH's is stable in pH four to nine.

(4) The range of operation optimal temperature; it is 37 \*\* from a room temperature (refer to drawing 2).

[0016](5) Activation; as shown in Table 1, it is remarkably activated with sulfhydryl group reducing agents, such as cystein, 2-mercaptoethanol, and dithiothreitol.

表 1

| チオール化合物      | 濃 度<br>(mM) | 残存活性<br>(%) |
|--------------|-------------|-------------|
| な し          | —           | 1 0 0       |
| システイン        | 1           | 7 7 6 0     |
|              | 5           | 8 5 3 0     |
|              | 1 0         | 7 6 9 0     |
|              |             |             |
| 2-メルカプトエタノール | 1           | 7 2 9 0     |
| ジチオスレイトール    | 1           | 8 4 1 0     |

[0017](6) Inhibitor; as shown in Table 2, chymostatin, leupeptin, E-64, antipain, EDTA, TPCK, TLCK, etc. receive strong activity inhibition. However, into a cystatin group, it is not influenced at all (an egg white cystatin, the Homo sapiens cystatin S, etc.).

表 2

| 化 合 物             | 濃 度            | 残存活性 (%) |
|-------------------|----------------|----------|
| な し               | —              | 100      |
| キモスタチン            | 50 $\mu$ g/ml  | 2        |
| TPCK              | 1mM            | 5        |
| TLCK              | 1mM            | 20       |
| PMSF              | 1mM            | 76       |
| エラストチナール          | 50 $\mu$ g/ml  | 83       |
| DFP               | 1mM            | 111      |
| ロイペプチン            | 50 $\mu$ g/ml  | 0        |
| E-64              | 50 $\mu$ g/ml  | 4        |
| アンチパイン            | 50 $\mu$ g/ml  | 7        |
| ヨード酢酸             | 1mM            | 33       |
| 卵白シスタチン           | 50 $\mu$ g/ml  | 118      |
| ヒトシスタチンS          | 500 $\mu$ g/ml | 125      |
| ペプスタチン            | 50 $\mu$ g/ml  | 112      |
| EDTA              | 1mM            | 18       |
| EGTA              | 1mM            | 45       |
| ホスホラミドン           | 1mM            | 46       |
| CaCl <sub>2</sub> | 1mM            | 133      |
| MgCl <sub>2</sub> | 1mM            | 139      |
| FeCl <sub>2</sub> | 1mM            | 87       |
| ZnCl <sub>2</sub> | 1mM            | 68       |

[0018](7) Molecular weight; molecular weights which determined a molecular weight on appearance for which it asked by gel filtration by about 50 kDa(s) and SDS gel electrophoresis are about 44 kDa(s).

(8) Others; isoelectric point pH5-5.5 [0019]And it is presumed that the above-mentioned enzyme has structure or this which is shown by a lower formula, and a similar peptide sequence. In a formula, a base sequence which encodes the peptide sequence concerned was also shown collectively.

[0020]

[Formula 1]



```

TTTAATGCATAAATACAGAAGGGGTACTACACAGTAAATCATATTCTAATTTTCATCAAA 60
ATGAAAAAATTGAACAAAGTTTGTTCGATGCTCTTTGCTCTTCCTTATTAGGAGGAATG 120
M K N L N K F V S I A L C S B L L G G M 20
GCATTTGCGCAGCAGACAGAGTTGGGACGCAATCCGAATGTCAGATTGCTCGAATCCACT 180
A F A Q Q T E L G R N P N V R L L E S T 40
CAGCAATCGGTGACAAAGGTTTCAAGTTCCGTATGGACAACTCAAGTTCCCGAAGTTCAA 240
Q Q S V T K V Q P R M D N L K F T E V Q 60
ACCCCTAAGGGAATGGCACAAGTCCCGACCTATACAGAAGGGGTTAATCTTTCCGAAAAA 300
T P K G M A Q V P T Y T E G V N L S E K 80
GGCATGCTACGCTTCOCATTCTATCAOGCTCTTTGGCGGTTTCAGACACTCGTGAGATG 360
G M P T L P I L S R S L A V S D T R E M 100
AAGGTAGAGGTTGTTTCTCAAGTTTCATCGAAAAGAAAAATGTCCTGATTGCACCCCTCC 420
K V E V V S S K F I E K K N V L I A P S 120
AAGGGCATGATTATGOGTAACGAAGATCCGAAAAAGATCCCTTACGTTTATGAAAGAGC 480
K G M I M R N E D P K K I P Y V Y G K S 140
TACTCGCAAAACAAATCTTCCCGGGAGAGATCGCCACGCTTGATGATCCCTTTATCCTT 540
Y S Q N K F F P G E I A T L D D P P I L 160
CGTGTGTCGCTGCGACAGGTTGTAACTTTGCGCCTTTGCAGTATAACCCCTGTGACAAAG 600
R D V R G Q V V N F A P L Q Y N P V T K 180
ACGTTGCGCATCTATACGGAATCACTGTGGCAGTGAGCGAACTTCGGAACAAGGCAAA 660
T L R I Y T E I T V A V S E T S E Q G K 200
AATATTCTGAACAAGAAAGGTACATTTGCCGCTTTGAAGACACATACAAGCGCATGTTT 720
N I L N K K G T F A G F E D T Y K R M F 220
ATGAACTACGAGCCGGGGCGTTACACACCGGTAGAGGAAAAACAAATGTCGTATGATC 780
M N Y E P G R Y T P V E E K Q N G R M I 240
GTCATCGTAGCCAAAAAGTATGAGGGAGATATTAAAGATTTGTTGATTGAAAAACCAA 840
V I V A K K Y E G D I K D F V D W K N Q 260
CGCGGTCTCGTACGAGGTGAAGTGGCAGAAGATATTGCTTCTCCGTTACAGCTAAT 900
R G L R T E V K V A E D I A S P V T A N 280
GCTATTACGAGCTTCTGTTAAGCAAGATACGAGAAAGGTAATGATTGACCTATGTT 960
A I Q Q F V K Q E Y E K E G N D L T Y V 300
CTTTFGGTTGGCGATCACAAGATATTCTGCAAAATTAATCCGGGGATCAAATCCGAC 1020
L L V G D H K D I P A K I T P G I K S D 320
CAGGTATATGGACAAATAGTAGGTAATGAOCCACTACAACGAAGTCTTCATCCGTCGTTTC 1080
Q V Y G Q I V G N D H Y N E V F I G R F 340
TCATGTGAGAGCAAGAGGATCTGAAGACACAAATCGATCGGACTATTCACTATGAGCGC 1140
S C E S K E D L K T Q I D R T I H Y E R 360
AATATAACCAACGAAGACAAATGGCTGGTCAAGGCTCTTTGTATTGCTTCGGCTGAAGGA 1200
N I T T E D K W L G Q A L C I A S A E G 380
GGCCCATCCGACAGCAATGGTGAAGTATATCCAGCATGAGAATGTAATCGCCAATCTC 1260
G P S A D N G E S D I Q H E N V I A N L 400
CTTACCCAGTATGGCTATACCAAGATTATCAAATGTTATGATCCGGGAGTAACCTCTAAA 1320
L T Q Y G Y T K I I K C Y D P G V T P K 420
AACATTATTGATGCTTTCAACGGAGGAATCTCGTTGGTCAACTATACGGGGCCACGGTAGC 1380
N I I D A F N G G I S L V N Y T G H G S 440
GAAACAGCTTGGGGTACGCTCTCACTTCGGCACCACTCATGTGAAGCAGCTTACCAACAGC 1440
E T A W G T S B F G T T H V K Q L T N S 460
AOCAGCTACCGTTTATTTTCGACGTAGCTTGTGTGAATGGCGATTTCCTATTTCAGCATC 1500
N Q L P F I F D V A C V N G D F L F S M 480
CCTTGCCTTCGAGAAGCCCTGATGCGTGCACAAAAGATGCTAAGCCGACAGGTACTGTT 1560
P C F A E A L M R A Q K D G K P T G T V 500
GCTATCATAGCGCTTACGATCAACCACTCTTGGGCTTCTCTATGCGCGCCAGGATGAG 1620
A I I A S T I N Q S W A S P M R G Q D E 520
ATGAACGAAATCTGTGCGAAAAACACCGAACAACATCAAGCGTACTTTTCGGTGGTGTG 1680
M N E I L C E K H P N N I K R T F G G V 540
ACCATGAACGGTATGTTTCTATGGTGGAAAAGTATAAAAAGGATGGTGAGAAGATGCTC 1740
T M N G M F A M V E K Y K K D G E K M L 560

```

[Formula 2]

```

GACACATGGACTGTTTTTCGGCCGACCCCTCCCTGCTCGTTCTGACACTTGTCCCGACCAA 1800
D T W T V F G D P S L L V R T L V P T K 580
ATGCAGGTTACGGCTCCGCTCAGATTAAATTGACGGATGCTTCAGTCAACGTATCTTGC 1860
M Q V T A P A Q I N L T D A S V N V S C 600
GATTATAATGGTGTCTATTGCTACCATTTTCAGCCAATGGAAGATGTTCTGGTTCTGCAGTT 1920
D Y N G A I A T I S A N G K M F G S A V 620
GTCGAAATGGAACAGCTACAATCAATCTGACAGGTCTGACAAATGAAAGCACGCTTACC 1980
V E N G T A T I N L T G L T N E S T L T 640
CTTACAGTAGTTGGTTACAACAAAGAGACGGTTATTAAAGACCATCAACACTAATGGTGAG 2040
L T V V G Y N K E T V I K T I N T N G E 660
CCTAACCCCTACCAGCCCGTTTCCAACTTGACAGCTACAACGACGGTTCAGAAAGTAAOG 2100
P N P Y Q P V S N L T A T T Q G Q K V T 680
CTCAAGTGGGATGCCAGGACGACGAAACCAATGCAACCACTAATACCGCTCGCAGCGTG 2160
L K W D A P S T K T N A T T N T A R S V 700
GATGGCATACGAGAATTGTTCTTCTGTCAGTCAGCGATGCCCCGAACTTCTTTCGCAGC 2228
D G I R E L V L L S V S D A P E L L R S 720
GGTCAGGCGGAGATTGTTCTTGAAGCTCAGCATGTTTGGAAATGATGATCCGGTTATCAG 2280
G Q A E I V L E A H D V W N D G S G Y Q 740
ATTCTTTTGGATGACAGCATGATCAATATGACAGGTTATACCCAGTGATACCCATACT 2340
I L L D A D H D Q Y G Q V I P S D T H T 760
CTTTGCGCGAAGTGTAGTGTCCCGGCCAATCTGTTCTCGCTCCGTTCCGAATATATCTGTTCCG 2400
L W P N C S V P A N L P A P F E Y T V P 780
GAAAATGCAGATCCTTCTTGTTCCTTACCAATATGATAATGGATGGTACTGCATCCGTT 2460
E N A D P S C S P T N M I M D G T A S V 800
AATATAACCGCGCGAACTTATGACTTTGCAATTGCTCTCTCTCAAGCAAATGCAAAGATT 2520
N I P A G T Y D F A I A A P Q A N A K I 820
TGGATTGCGGACAAAGGACGACGAAAGATGATTATGTTTGAAGCCGGTAAAAAA 2580
W I A G Q G P T K E D D Y V F E A G K K 840
TACCATTTCTTATGAAGAAGATGGGTAGCGGTGATGGAACGAAATGACTATAAGCGAA 2640
Y H F L M K K M G S G D C T E L T I S E 860
GGTGGTGAAGCGATTACACCTATCTGTCTATCGTGACGGCACGAAGATCAAGGAAGGT 2700
G G G S D Y T Y T V Y R D G T K I K E G 880
CTGACCGAAACGACCTACCGCGATGCAGGAATGAGTGCACAATCTCATGAGTATTGCGTA 2760
L T E T T Y R D A G M S A Q S H E Y C V 900
GAGGTTAAGTACGCAGCGCGGTATCTCCGAAGGTTTGTGTCGATATATATTCCTGACGGA 2820
E V K Y A A G V S P K V C V D Y I P D G 920
GTGGCAGACGTAACGGCTCAGAAGCCTTACACGCTGACAGTTGTTGGAAGACGATCAG 2880
V A D V T A Q K P Y T L T V V G K T I T 940
GTAACCTTGCCAAGGCGAAGTATGATCTACGACATGAACGGTCTGCTCTGGCAGCCGGT 2940
V T C Q G E R M I Y D M N G R R L A A G 960
CGCAACACAGTTGTTTACACGGCTCAGGGCGGCTACTATGCAGTCATGCTTGTGCTTGC 3000
R N T V V Y T A Q G G Y A V M V V V D 980
GGCAAGTCTTACGTAGAGAACTCGCTGTAAAGTAATCTGCTCTGGAAGTCCGAGACTTT 3060
G K S Y V E K L A V K * 991
GTGCAGACACTTTTAATATAGGTCTGTAATTGTC 3094

```

[0021]The antibody which recognizes specifically the enzyme of this invention which can be used for analysis of the above-mentioned this invention enzyme can be created by the publicly known method using Freund's (Freund) Freund's complete adjuvant, using this invention enzyme. It is as follows when the outline of the acquisition method of the antibody concerned is carried out to below.

[0022]That is, the refining enzyme liquid (about 1 mg) prepared as mentioned above is mixed with equivalent weight of Freund's Freund's complete adjuvant, the suspension is injected into several places over hypodermic, such as a rabbit, and this is repeated twice at intervals of two weeks. Then, a booster is performed once and antiserum is extracted. An antibody can be obtained as IgG fractionation by carrying out ammonium sulfate processing and protein A-sepharose (Pharmacia Corp., Sweden) column chromatography of the extracted antiserum.

[0023]What is necessary is just to carry out, for example as following, in order to find out a synthetic substrate specifically combined with an enzyme of this invention from the commercial available quality of a synthetic fluorescent group. namely, a reaction solution (20mM phosphate buffer solution.) containing a substrate, 5mM cystein, and the enzyme concerned of 10microM After warming pH 7.5 for 10 minutes at 40 \*\*, add 10mM iodoacetic acid solution (pH 5), and a reaction is stopped, What is necessary is to measure isolation of 4-methylcoumaryl 7-amide (AMC) with excited wavelengths of 460 nm, and a fluorescence wavelength of 380 nm, and just to consider it as a synthetic substrate which combines with an enzyme of this invention specifically a substrate which separates AMC.

[0024]Decomposition activity under the same conditions when various kinds of quality of a synthetic fluorescent group is used, i.e., the substrate specificity of this invention enzyme, is shown in Table 3. As a substrate recognized specifically, Z-Phe-Arg-MCA, Boc-Phe-Ser-Arg-

MCA, Boc-Gln-Ala-Arg-MCA, etc. are chosen as this invention enzyme from this result. These substrates can be purchased from Peptide Institute (Osaka).

[0025]

表 3

| 基 質<br>合成基質 (10 $\mu$ M)    | 活 性<br>( $\mu$ mol/mg/min) | 最大活性<br>(%) |
|-----------------------------|----------------------------|-------------|
| Boc-Phe-Ser-Arg-MCA         | 16600                      | 100         |
| Boc-Gln-Ala-Arg-MCA         | 11600                      | 70          |
| Z-Phe-Arg-MCA               | 16400                      | 99          |
| Z-Arg-Arg-MCA               | 1300                       | 8           |
| Boc-Glu-Lys-Lys-MCA         | 0                          | 0           |
| Boc-Val-Leu-Lys-MCA         | 160                        | 1           |
| Arg-MCA                     | 670                        | 4           |
| Lys-MCA                     | 0                          | 0           |
| Leu-MCA                     | 1500                       | 9           |
| Ala-MCA                     | 170                        | 1           |
| Gly-Pro-MCA                 | 2000                       | 12          |
| Lys-Ala-MCA                 | 500                        | 3           |
| Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA     | 0                          | 0           |
| Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA     | 0                          | 0           |
| Suc-Ala-Pro-Ala-MCA         | 0                          | 0           |
| Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA | 0                          | 0           |
| Suc-Gly-Pro-MCA             | 0                          | 0           |

[0026]The enzyme activity which above-mentioned *P. gingivalis* which exists in a \*\*\*\* field produces can measure a synthetic substrate which recognizes the enzyme concerned specifically, for example by a following method, and/or the enzyme concerned using an antibody etc. which are recognized specifically.

[0027]A measuring method of an enzyme of this invention which exists in a \*\*\*\* field can specifically be performed as follows.

[0028](1) Extraction of sample liquid; as subject which extracts sample liquid, a clinical patient without a general disease who is slight or has advanced periodontitis is suitable, and a tested part chooses periodontal pocket to which absorption of an alveolar bone of clear vertical nature is accepted on an X ray.

[0029]Extraction of crevicular exudate (GCF) removes a gingival-margin top plaque carefully after simple exclusion of moisture first, and extracts GCF using PERIO pay parsed Lipps (Harco Electronics, Canada). Extraction is continuously performed for 30 seconds at a time using pay [ of three sheets ] parsed Lipps. The amount of GCF(s) measures volume which oozes out per unit time applying 2nd pay parsed Lipps to PERIO TRON 6000 (Harco Electronics, Canada).

[0030](2) Measurement of enzyme activity; perform ultrasonication for 5 minutes and use centrifugal supernatant liquid as a sample solution, after dipping pay [ of three sheets ] parsed Lipps in phosphate-buffered-saline liquid (pH 7.4) of 300microl ice-cooled beforehand and neglecting it at 0 \*\* for 5 to 6 hours. First, after adding a constant rate of substrates (for example, Z-Phe-Arg-MCA, Boc-Phe-Ser-Arg-MCA, etc.) and cysteins to this and warming at about 40 \*\* using a part of sample liquid, an iodoacetic acid solution etc. are added and a



reaction is stopped. Subsequently, isolation of 4-methylcoumaryl 7-amide (AMC) can be measured with excited wavelengths of 460 nm, and a fluorescence wavelength of 380 nm, and enzyme activity can be searched for from decomposition activity over the above-mentioned substrate.

[0031] At this time, an active mass checked in existence of EDTA (10mM) and leupeptin (50microM) turns into the amount of enzymes concerned as a rule of thumb (refer to drawing 3). However, a substrate to be used is not recognized only with the enzyme concerned and the amount of enzymes in this stage may receive decomposition also by the other protease. Therefore, after adding a specific antibody to the enzyme concerned to a part of sample liquid and making it react for 10 minutes at 37 °C, further, Reaction mixture is centrifuged and it separates into solid phase (immune complex) and the liquid phase, and if an active mass which measured decomposition activity over the above-mentioned substrate in the liquid phase, and shifted to solid phase is computed, it will mean that the more exact amount of enzymes concerned was determined.

[0032] Therefore, what is necessary is just to take the following process, in order to search for more exact enzyme activity.

(1) A part of sample is made to react to a substrate of this invention enzyme under EDTA and ROPEPUSHIN existence, The amount of this invention enzyme activity is computed by deducting the enzyme activity of the process 2 from the enzyme activity of the (2) (3) which divides reaction mixture concerned into solid phase and the liquid phase, and subsequently measures enzyme activity according to the above (1) after making antibody to this invention enzyme act on a part of sample concerned process 1 which measures enzyme activity.

[0033] What is necessary is just to use a kit for periodontopathic-bacteria origin enzyme measurement containing a substrate, (c) leupeptin, and (d) EDTA which are specifically recognized by enzyme an antibody specifically combined with the enzyme according to claim 1, and given in (a) (b) Claim 1, in order to measure an enzyme of this invention simpler.

[Function] This invention is based on this invention enzyme being peculiar to *P. gingivalis*, as shown in the after-mentioned table 4. And the relation of the activity rise of this invention enzyme and the condition of periodontosis in a periodontosis patient's parodontal pocket is as the following. That is, it turns out that the amount of enzymes concerned in the exudate extracted from the periodontitis patient's gingival sulcus increases in proportion to the increase in the amount of exudates per unit time (increase in a PERIO TRON value) (refer to drawing 4). That is, although the amount of enzyme activity concerned in a stage with the minor amount of exudates is very low, when the active mass increases, the quantity increases remarkably with the condition of the degree of middle class and it becomes serious as the amount of exudates increases, it turns out that it increases further.

[0034] Between the increase in the amount of exudates, and the condition of disease of periodontitis. If there is \*\*\*\*\*, generally it will be reported. (Cimasoni G.: Crevicular Fluid Updated. In: Myers HM, ed. Monographs in Oral Sciences. Basel, Karger, pp.1-152, 1983). Considering that correlation is also between \*\*\*\*\* volume and other clinical parameters (a gingival index and Plaque Index), the above-mentioned result shows that correlation is between the active mass of the enzyme concerned and the condition of periodontosis which periodontopathic-bacteria *P. gingivalis* produces. Therefore, based on the measured value of the enzyme activity of the periodontopathic-bacteria origin obtained using the method of this invention, objective judgement becomes possible [ about the condition of disease in each periodontosis patient ].

[0035]. The enzyme concerned already. 50kDa cysteine protease of the *P. gingivalis* origin known (JINJI pane (gingipain); Chen Z, Potempa J, Polanowski A, Wikstrom M, Travis J: Purification and ) characterization of. a 50-kDa cysteine proteinase. (gingipain) Although it is similar in enzymology character, such as from *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem.

267:18896-18901, 1992 and optimal pH, and susceptibility over inhibitor, In character, such as substrate specificity and thermal stability, it is different, and the enzyme concerned has the very important character which was closely related to the following periodontosis which is not clarified with the publicly known above-mentioned enzyme, and it is clear that it is a new enzyme.

[0036]Namely, the thing which the protease inhibitor of important living body origin, such as disassembling protein, such as type I collagen and an immunoglobulin, well (refer to drawing 5), a cell pin, and a cystatin, is hard to receive inhibition, Although it exists in two or more stocks of controlling the function of a polymorphonuclear leukocyte to concentration dependence and time dependency (refer to drawing 6 and drawing 7), and P. gingivalis which differs in serotype in common, it does not exist in the culture supernatant of the bacteria or enterobacilli which are called other periodontopathic bacteria -- etc. (refer to Table 4) etc. -- it is shown clearly that the enzyme concerned has a role important for direct destruction of the periodontium, destruction of a living body's defense system, etc. as a periodontopathic factor peculiar to P. gin JIBARISU. Therefore, it is useful in diagnosis of periodontosis to measure this invention enzyme in a periodontosis patient's crevicular exudate.

[0037]

表 4

| 培 養 上 清                       | プロテイン分解活性 (%) |                     |
|-------------------------------|---------------|---------------------|
|                               | Z-Phe-Arg-MCA | Boc-Phe-Ser-Arg-MCA |
| P. ジンジバリス                     |               |                     |
| 381                           | 100.0         | 100.0               |
| ATCC 33277                    | 60.8          | 78.0                |
| W50                           | 90.4          | 99.1                |
| SU63                          | 56.9          | 63.6                |
| 14018                         | 91.4          | 98.2                |
| 1112                          | 66.4          | 70.3                |
| GAI 7802                      | 72.7          | 82.8                |
| P. インターメディア                   |               |                     |
| ATCC 25611                    | 0.2           | 0.2                 |
| P. メラニノゲニア                    |               |                     |
| ATCC 25845                    | 0.1           | 0.1                 |
| B. フラギリス                      |               |                     |
| RIMD 0230001                  | 0.2           | 0.2                 |
| ATCC 25285                    | 0.3           | 0.9                 |
| A. アクチノマイセテムコミタンス             |               |                     |
| ATCC 29522                    | 0.3           | 0.2                 |
| ATCC 29523                    | 0.5           | 1.0                 |
| S. ミュータンス                     |               |                     |
| 6715                          | 0.9           | 0.9                 |
| S. サングイス                      |               |                     |
| ATCC 10557                    | 0.2           | 0.2                 |
| E. コリ                         |               |                     |
| W3350                         | 0.2           | 0.1                 |
| S. チフィムリウム                    |               |                     |
| B2245                         | 0.1           | 0.1                 |
| ブレイン・ハート・インフュージョン<br>ブロス (対照) | 0.2           | 0.2                 |
| トリプティケース・ソイブロス<br>(対照)        | 0.0           | 0.0                 |

[0038] Although Table 4 shows the result of having measured the amount of enzyme activity concerned contained in the culture supernatant of the bacteria and enterobacilli which are called two or more stock culture supernatant and other periodontopathic bacteria of *P. gingivalis* which differs in serotype using two sorts of synthetic substrates, It is shown that this invention enzyme is peculiar to *P. gingivalis*.

[0039] Therefore, since the enzyme concerning this invention has the above enzymology character, it can obtain the above-mentioned enzyme made into the purpose by performing refining by making the character concerned into an index from the culture supernatant of *P.*



gingivalis which usually exists in the Homo sapiens \*\*\*\*.

[0040]

[Example]Hereafter, working example explains this invention in detail.

[0041]Fruit Example [ of \*\* ] 1P. refining of a gin JIBARISU origin enzyme and enzymology character: The enzyme of this invention was refined as follows. P. Gin JIBARISU

Ammonium sulfate was added to 381 shares of culture supernatants, and it was considered as saturation 70%. Precipitate was collected by centrifugality and it dialyzed to 10mM phosphate buffer solution (A liquid) containing the 0.05% bridge 35 of a nonionic surfactant. After condensing the non-adsorbing fractionation obtained by applying centrifugal dialysis supernatant liquid to the DEAE Sephacel column equilibrated with A liquid, it applied to CM \*\*TOYO pearl column further equilibrated with A liquid (drawing 8).

[0042]After the buffer solution often washed the column, the enzyme activity fraction concerned was eluted with the buffer solution containing 70mM salt. The eluate fraction was applied to isoelectric point separation of pH 3.5 to 10 range after concentration and dialysis (refer to drawing 9). Activity fractions (pH 5.0-5.5) were collected, and it refined after concentration and dialysis by performing gel filtration of TSK gel G2000SW equilibrated with 10mM phosphate buffer solution containing 0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (refer to drawing 10).

[0043]Change of the protocol of the refining method of a periodontopathic-bacteria P. gingivalis origin enzyme and active masses (all the activity, specific activity, etc.) when Z-Phe-Arg-MCA is used as a substrate is shown in Table 5.

[0044]

表 5

| 工 程      | プロテイン<br>(mg) | 全ユニット<br>(U, ×10 <sup>-3</sup> ) | 特異活性<br>(U/mg) | 収 率<br>(%) | 倍 数 |
|----------|---------------|----------------------------------|----------------|------------|-----|
| 硫酸分画     | 1270          | 1450                             | 1140           | 100        | 1   |
| DEAE-    | 188           | 1130                             | 6000           | 78         | 5   |
| セファセル    |               |                                  |                |            |     |
| CM-トヨパール | 27            | 259                              | 9600           | 18         | 8   |
| 650S     |               |                                  |                |            |     |
| 等電点分離    | 11            | 168                              | 15300          | 12         | 13  |
| TSKゲル G  | 7             | 116                              | 16600          | 8          | 15  |
| 2000SW   |               |                                  |                |            |     |

[0045]real -- \*\* example 2 -- anti- -- The body \*\* \*\* Singularity : The antibody used in the measuring method of the enzyme of this invention was created as follows. P. The enzyme liquid (about 1 mg) concerned refined from the culture supernatant of gin JIBARISU was mixed with equivalent weight of Freund's (Freund) Freund's complete adjuvant, the suspension was injected into several places over the hypodermic of a rabbit, and this was repeated twice at intervals of two weeks. Then, the booster was performed once and antiserum was extracted.

[0046]Measurement was presented with antiserum as IgG fractionation with ammonium sulfate processing and protein A-sepharose (Protein A-Sepharose) (Pharmacia Corp., Sweden) column chromatography. The singularity of an antibody is checked with the nonresponsiveness in that the IgG fractionation obtained from the rabbit which prescribed for the patient only Freund's complete adjuvant which does not contain the enzyme concerned used as contrast does not neutralize the enzyme activity concerned at all, or Western

BUROTTENGU. The antibody to the enzyme concerned is a useful thing which has very high singularity from not checking any protease activities of the culture supernatant of other periodontopathic bacteria.

[0047]Fruit Example of \*\* 3 \*\* Base Measuring method : P. of this invention The measuring method of the enzyme of gin JIBARISU origin was performed as follows. First, using Z-Phe-Arg-MCA or Boc-Phe-Ser-Arg-MCA as a substrate, this substrate solution (a 10microM substrate / 5mM cystein / 20mM phosphate buffer solution, pH 7.5) is added to specimen solution, and an incubation is carried out for 10 minutes at 40 \*\*. The fluorometry (excited wavelengths of 380 nm, fluorescence wavelength of 460 nm) using a spectrophotofluorometer determines the amount of AMC(s) which added tales doses of 10mM iodoacetic acid solutions (pH 5), stopped the reaction, and separated it. At this time, same measurement is performed under existence of EDTA (10mM) and leupeptin (50microM), and the active mass from which any substance is prevented turns into the amount of enzymes concerned.

[0048]After adding the specific antibody to the enzyme concerned to a part of specimen solution and making it react for 10 minutes at 37 \*\*, Reaction mixture is centrifuged and it separates into solid phase (immune complex) and the liquid phase, and if the active mass which measured the decomposition activity over the above-mentioned substrate in the liquid phase, and shifted to solid phase is computed, the amount of enzymes concerned can be measured more correctly.

[0049]

[Effect of the Invention]The measuring method of a periodontopathic-bacteria origin enzyme objective [ this invention ] and simple is provided. By using the measuring method of the enzyme of this invention, it becomes possible to grasp exactly, without diagnosing objective conventionally depending for the advancing state and activity of the difficult periodontosis on experience, and contributes greatly in the cure for a dentistry field. The antibody to the enzyme of this invention can also expect (refer to drawing 11), prevention of periodontosis, and the use as a treating agent, in view of checking the reaction depressor effect of the polymorphonuclear leukocyte which this invention enzyme besides an analytical reagent has.

[0050]

[Layout Table]array number: -- length [ of 1 arrangement ]: -- mold [.of 991 arrangement ]: -- amino acid topology: -- kind [ of arrangement ]: -- peptide \*\* Sequence[Formula 3]

```

TTTAATGCATAAATACAGAAGGGGTACTACACAGTAAATCATATTCTAATTTTCATCAAA 60
ATGAAAAAAGTTGAACAAGTTTGTTCGATTGCTCTTTGCTCTTCCTTATTAGGAGGAATG 120
M R N L N K F V S I A L C S S L L G G M 20
GCATTTGCGCAGCAGACAGAGTTGGGACGCAATCCGAATGTCAGATTGCTCGAATCCACT 180
A F A Q Q Q T E L G R N P N V R L L E S T 40
CAGCAATGGGTGACAAAGTTTCAGTTCCGTATGGACAACCTCAAGTTACCGAAGTTCAA 240
Q Q S V T K V Q P R M D N L K P T E V Q 60
ACCCCTAAGGGAATGGCACAAGTCCCGACCTATACAGAAGGGGTTAATCTTTCCGAAAAA 300
T P K G M A Q V P T Y T E G V N L S E K 80
GGGATGCTTACGCTTCOCATTCTATCAOGCTCTTTGGCGGTTTCAGACACTGCTGAGATG 360
G M P T L P I L S R S L A V S D T R E M 100
AAGGTAGAGGTTGTTTCTCAAGTTTCATCGAAAAGAAAAATGTCCTGATTGCAACCTCC 420
K V E V V S S K F I E K K N V L I A P S 120
AAGGGCATGATTATGCGTAACGAAGATCCGAAAAGATCCCTTACGTTTATGGAAGAGC 480
K G M I M R N E D P K K I P Y V Y G K S 140
TACTCGCAAAACAAATTCCTCCCGGAGAGATCGCCACGCTTGATGATCCTTTTATCCTT 540
Y S Q N K F F P G E I A T L D D P P I L 160
CGTATGTCGCTGGACAGGTTGTAACCTTTCGCGCTTTGCACTATAACCTGTCGACAAAG 600
R D V R G Q V V N F A P L Q Y N P V T K 180
ACGTTGCGCATCTATAOGGAAATCACTGTGGCAGTGAAGCAACTTCGGAACAAGGCAAA 660
T L R I Y T E I T V A V S E T S E Q G K 200
AATATTCTGAACAAGAAAGGTACATTTGCGGCTTTGAAGACACATACAGCGCATGTTTC 720
N I L N K K G T F A G F E D T Y K R M F 220
ATGAACCTACGAGCGGGCGGTTACACACCGGTAGAGGAAAAACAAATGGTCTATGATC 780
M N Y E P G R Y T P V E E K Q N G R M I 240
GTCATCGTAGCCAAAGATATGAGGGAGATATTAAGATTTCGTTGATTGGAACCAACAA 840
V I V A K K Y E G D I K D F V D W K N Q 260
CGCGGTCTCGTACGAGGTGAAGTGGCAGAAGATATTGCTTCTCCGTTACAGCTAAT 900
R G L R T E V K V A E D I A S P V T A N 280
GCTATTACAGCTTCGTTAGCAAGAATACGAGAAGAGTAATGATTGACCTATGTT 960
A I Q Q F V K Q E Y E K E G N D L T Y V 300
CTTTTGGTTGGCGATCACAAGATATTCCTGCCAAATTAATCCGGGGATCAATCCGAC 1020
L L V G D H K D I P A K I T P G I K S D 320
CAGGTATATGGACAAATAGTAGGTAATGAOCTACAAAGCTTTCATCGGTCGTTTC 1080
Q V Y G Q I V G N D H Y N E V F I G R F 340
TCATGTGAGAGCAAGAGGATCTGAAGACACAAATCCATCGGACTATTCACTATGAGCGC 1140
S C E S K E D L K T Q I D R T I H Y E R 360
AATATAACCAAGGAAGACAAATGGCTCGGTGAGGCTCTTTGATTGCTTCGGCTGAAGGA 1200
N I T T E D K W L G Q A L C I A S A E G 380
GGCCCATCCGACAGCAATGGTGAAGTGATATCCAGCATGAGAATGTAATCGCCAATCTG 1260
G P S A D N G E S D I Q H E N V I A N L 400
CTTACCCAGTATGGCTATACCAAGATTATCAAAATGTTATGATCCGGGAGTAACCTCTAAA 1320
L T Q Y G Y T K I I K C Y D F G V T P K 420
AACATTATGATGCTTTCAAGGAGGAATCTGTTGGTCAACTATAACGGGCCACGGTAGC 1380
N I I D A F N G G I S L V N Y T G H G S 440
GAAACAGCTTGGGGTACGCTCTACCTTCGGCACCACATGTAAGCAGCTTACCAACAGC 1440
E T A W G T S H F G T T H V K Q L T N S 460
AACCAGCTACCGTTTATTTTCGACGTAGCTTGTGTGAATGGCGATTTCCTATTCAGCATG 1500
N Q L P F I F D V A C V N G D F L F S M 480
CCTTGGCTTCGCAAGCCCTGATGCGTGCAAAAAGATGGTAAGCCGACAGGTACTGTT 1560
P C F A E A L M R A Q K D G K P T G T V 500
GCTATCATACGCTCTACGATCAACCACTCTTGGGCTTCTCTATGCGCGGCGCAGATGAG 1620
A I I A S T I N Q S W A S P M R G Q D E 520
ATGAACGAAATTCGTGGAACCAACCCGAAACATCAAGCGTACTTTTCGGTGGTGTC 1680
M N E I L C E K H P N N I K R T F G G V 540
ACCATGAACGGTATGTTTCTATGGTGAAAAGTATAAAAAGGATGGTGAGAAGATGCTC 1740
T M N G M F A M V E K Y K K D G E R M L 560

```

[Formula 4]

GACACATGGACTGTTTTCGGCGACCCCTCGCTGCTGTTTCGTACACTTGTCCCGACCAAA 1800  
D T W T V F G D P S L L V R T L V P T K 580  
ATGCAGGTTACGGCTCCGGCTCAGATTAAATTTGACGGATGCTTCAGTCAACGTATCTTGC 1860  
M Q V T A P A Q I N L T D A S V N V S C 600  
GATTATAATGGTGCTATTTGCTACCATTTTCAGCCAATGGAAAGATGTTTCGGTTCTGCAGTT 1920  
D Y N G A I A T I S A N G R M F G S A V 620  
GTCGAAAATGGAACAGCTACAATCAATCTGACAGGCTCTGACAAAATGAAAGCACGGCTTACC 1980  
V E N G T A T I N L T G L T N E S T L T 640  
CTTACAGTAGTTGGTTACAACAAAGAGACGGTTATTAAGACCATCAACACTAATGGTGAG 2040  
L T V V G Y N K E T V I K T I N T N G E 660  
CCTAACCCCTACCAGCCCGTTTCCAACTTGACAGCTACAACGCGAGGGTCAGAAAGTAAAG 2100  
P N P Y Q P V S N L T A T T Q G Q K V T 680  
CTCAAGTGGGATGCACCGAGCAGCAAAACCAATGCAACCACTAATACCGCTCGCAGCGTG 2160  
L K W D A P S T K T N A T T N T A R S V 700  
GATGGCATAAGAGATTTGGTTCTTCTGTGTCAGTCAGCGATGCCCCGAACTTCTTCGCAGC 2220  
D G I R E L V L L S V S D A P E L L R S 720  
GGTCAGGCGAGATTGTTCTTGAAGCTCAGATGTTTGAATGATGGATCCGGTTATCAG 2280  
G Q A E I V L E A H D V W N D G S G Y Q 740  
ATTCTTTTGGATGCAGACCATGATCAATATGGACAGGTTATACCCAGTGCATACCCATACT 2340  
I L L D A D H D Q Y G Q V I P S D T H T 760  
CTTTCGGCGAACGTAGTGTCCCGGCCAATCTGTTCCGCTCCGTTTCAATATATCTGTTCCG 2400  
L W P N C S V P A N L F A P F E Y T V P 780  
GAAAATGCAGATCCTTCTTGTTCCTTACCAATATGATAATGGATGGTACTGCTATCCGTT 2460  
E N A D P S C S P T N M I M D G T A S V 800  
AATATAACCGGCCGGAATTTATCACTTTGCAATTTGCTGCTCTCTCAAGCAAATGCAAAGATT 2520  
N I P A G T Y D F A I A A P Q A N A K I 820  
TGGATTGCGGACAAGGACCGACGAAAGAAGATGATTATGTTTGAAGCCGGTAAAAAA 2580  
W I A G Q G P T K E D D Y V F E A G K K 840  
TACCAATTTCTTATGAAGAAGATGGGTAGCGGTGATGGAACGAAATTGACTATAAGCGAA 2640  
Y H F L M K K M G S G D G T E L T I S E 860  
GGTGGTGAAGCGATTACACCTATACGTCTATCGTGACCGCACGAAGATCAAGGAAGGT 2700  
G G G S D Y T Y T V Y R D G T K I K E G 880  
CTGACCGAAACGACCTACCGGATGCAGGAATGAGTGCACAATCTCATGAGTATTCGCTA 2760  
L T E T T Y R D A G M S A Q S H E Y C V 900  
GAGGTTAAGTACGACGCGCGGTATCTCCGAAGGTTTGTGTTGATTATATTCCTGACCGGA 2820  
E V K Y A A G V S P K V C V D Y I P D G 920  
GTGGCAGACGTAACGGCTCAGAAGCCTTACACGCTGACAGTTGTTGGAAGACGATCAGG 2880  
V A D V T A Q K P Y T L T V V G K T I T 940  
GTAACCTTGCAAGCGCAACGTATGATCTACGACATGAACGGTCTGCTCTGGCAGCCGCT 2940  
V T C Q G E R M I Y D M N G R R L A A G 960  
CGCAACACAGTTGTTTACACGGCTCAGGGCGGCTACTATGCAATCATGTTGTTGCTTAC 3000  
R N T V V Y T A Q G G Y Y A V M V V V D 980  
CGCAAGTCTTACGTAGAGAACTCGCTGTAAGTAATTCGTCTTGGACTCGGAGACTTT 3060  
G K S Y V E K L A V K \* 991  
GTGCAGACACTTTTAAATATAGGTCGTAAATTGTC 3094

[Translation done.]